

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-130875

(P2003-130875A)

(43) 公開日 平成15年5月8日(2003.5.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
	1/34		Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 37/00	1 0 2

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-191311(P2002-191311)

(22) 出願日 平成14年6月28日(2002.6.28)

(31) 優先権主張番号 2001-37819

(32) 優先日 平成13年6月28日(2001.6.28)

(33) 優先権主張国 韓国 (K R)

(71) 出願人 502235773
バイオニア コーポレーション
大韓民国, 306-220 テジョン, テドク
グ, ムンピョンードン, 49-3

(72) 発明者 ハン オ, バク
大韓民国, 306-220 テジョン, テドク
グ, ムンピョンードン, 49-3

(72) 発明者 ジン テ, ジョン
大韓民国, 306-220 テジョン, テドク
グ, ムンピョンードン, 49-3

(74) 代理人 100080034
弁理士 原 謙三 (外3名)

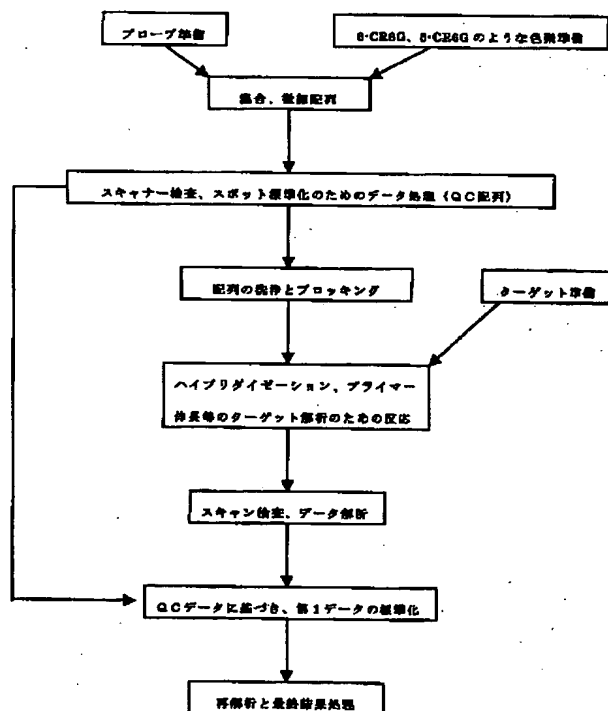
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学物質微細配列チップの品質検査方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】生化学物質微細配列チップを用いた各種検査の正確度を高めるための生化学物質微細配列チップの品質検査方法を提供する。更なる目的は、プローブと、前記プローブとは反応せずに光または熱を発する化合物との混合物が基板上に微細配列されている生化学物質微細配列チップを提供する。

【解決手段】生化学物質を微細配列したチップの品質検査方法に関し、より詳しくは、DNA、RNA、タンパク質などの生化学物質と反応せずに光または熱を発する化合物と、生化学的プローブとを混合して微細配列チップを制作し、該チップの各スポットの発光度または発熱度及び配列の様相を測定し、微細配列された各スポットの配列の均一性及び正確度を予め制御することにより、生化学物質微細配列チップを用いた各種検査の正確度を高めるための生化学物質微細配列チップの品質検査を行う。



【特許請求の範囲】

【請求項1】プローブ (probe) と反応せずに光または熱を発する化合物と、プローブとを混合する段階1と、

前記混合物を基板に微細配列させる段階2と、

前記微細配列された混合物のスポットをスキャンして蛍光または熱を測定する段階3と、を含む生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項2】前記段階3で測定された蛍光または熱を通じて混成化以降の蛍光や熱を算定する段階を更に含む請求項1に記載の生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項3】前記プローブとターゲットとを混成化し蛍光や熱を測定する段階及び混成化以降の蛍光や熱の測定値を用いて補正係数を求め、

スポット間の誤差を標準化させる段階を更に含む請求項2に記載の生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項4】前記プローブは、核酸 (nucleic acid)、アミノ酸 (amino acid) などを含むペプチド (peptide)、多糖類 (Polysaccharide)、リン脂質 (phospholipid) などの単量対が線形または円形で結合している生体高分子からなる群より選択されたことを特徴とする請求項1に記載の生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項5】前記生化学物質と反応せずに光または熱を発する化合物は、蛍光を発する物質 (fluorescent material)、化学的発光物質 (chemiluminescent material)、生物学的発光物質 (bioluminescent material)、熱量測定可能物質 (calorimetric material)、光散乱物質 (light-scattering material) からなる群より選択されたことを特徴とする請求項1に記載の生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項6】前記生体高分子物質が核酸の連続的な序列である場合、プローブと反応せずに光または熱を発する化合物は、フルオレセイン (Fluorescein)、クマリン (Coumarin)、4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレセイン (JOE; 4', 5'-Dichloro-2', 7'-dimethoxyfluorescein)、テトラメチルローダミン (TAMR; Tetramethylrhodamine)、X-ローダミン (ROX; X-rhodamine)、エオシン (Eosin)、オレゴングリーン (Oregon Green)、ローダミングリーン (Rhodamine Green)、ローダミンレッド (Rhodamine Red)、テキサスレッド (Texas Red)、ローダミンからなる群より選択されることを特徴とする請求項5に記載の生化学物質微細配列チップの品質検査方法。

学物質微細配列チップの品質検査方法。

【請求項7】プローブと、前記プローブと反応せずに光または熱を発する化合物との混合物が基板上に微細配列されている生化学物質微細配列チップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生化学物質を微細配列したチップの品質検査方法に関し、より詳しくは、DNA、RNA、タンパク質などのような生化学物質と反応せずに光または熱を発する化合物と、生化学的プローブ (probe) とを混合して微細配列チップを制作し、該チップのスポットの発光度または発熱度及び配列の様相を測定し、微細配列されたスポットの配列の均一性及び正確度を予め制御することにより、生化学物質微細配列チップを用いた各種検査の正確度を高めるための生化学物質微細配列チップの品質検査方法に関するものである。

【0002】生化学物質微細配列チップとは、多数のDNA、RNA、またはタンパク質の切片を小さな基板上で高密度に固定した遺伝子またはタンパク質検索用装置をいう。このようなチップ技術は、DNAの変異とRNAの発現の様相及びタンパク質機能に対する大量分析研究と遺伝子の機能とを把握するための研究に使われている。

【0003】従って、生化学物質微細配列チップ (以下、バイオチップと略記) は、固定させる生化学物質の種類及び大きさによりcDNAチップ、オリゴヌクレオチドチップ (oligonucleotide chip)、タンパク質チップなどに分けられ、前記cDNAチップには少なくとも500塩基対以上の長さを有する遺伝子 (full-length open leading frameまたはExpressed sequence tag, EST) が付着されており、オリゴヌクレオチドチップ (oligonucleotide chip) には約15~25個の塩基対からなるオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) が固定されている。

【0004】従って、生化学物質微細配列チップの基板上で高密度に微細配列されるプローブは主にプラスミドデオキシリボ核酸 (plasmid DNA) やオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) やタンパク質などの形態を有し、これらは主に遺伝子発現の様相、タンパク質の活性、DNA変異などを探知するのに利用されている。

【0005】

【従来の技術】現在、DNAチップを用いて行っている通常の研究では、正常細胞と非正常細胞との間のRNA発現の差をみている。例えば、ヒトの正常細胞とガン細胞とのRNA発現様相の分析が主に行われている。全遺伝子に対する情報が知られている酵母 (Saccha

romyces cerevisiae) の場合は、6000個の遺伝子の全てに対する発現様相及び発現体系の分析を高密度オリゴヌクレオチドチップ (oligonucleotide chip) を用い、同時に把握しようとする研究が行われている。

【0006】DNAチップ上に微細配列されるプローブは、相補的DNA (cDNA) を含むプラスミドデオキシリボ核酸、PCR (polymerase chain reaction) 産物、または合成オリゴヌクレオチド (oligonucleotide) の形態をもつ。プローブを基板上に配列させる方法は、基板上にフォトリソグラフィ (photolithography; Affymetrix Inc.) 方式や、インクジェット (Ink-Jet) 噴射方式を用いた非接触噴射 (Piezoelectric printing; Packard Instrument Inc., Syringe-solenoid printing; Cartesian Technologies) や、接触方式 (Quill and Split Pin; Telechem International Inc., Pin and Ring; Genetic Microsystem, Capillary pin; Bioneer Corp.) などがある。

【0007】しかし、どのような方式の微細配列方法においても、基板として用いられるスライドガラス (slide glass) の種類による影響や波長測定時に生じる電氣的ノイズ (noise) やスポットの蒸発などのような問題により、微細配列された各スポット間、またはこれらを含む各チップ間に配列されたプローブの量が均一ではなく、又、スポット配列の形態 (feature) が一定になるように生産することができない。

【0008】特に、フォトリソグラフィ方式を用いて基板上で直接オリゴ (oligo) 形のプローブを合成する場合は、合成反応の失敗によりオリゴ分子が一つのスポット内においても均質 (homogeneous) でないという致命的な問題点を示している。

【0009】また、微細配列されるプローブの量及び様相の変異は、RNA発現様相の差を調べようとする研究では最終結果を解析するのに誤りを招く要因として作用し、DNAの変異を探知するのに使用されるチップの場合も、より詳細な結果解析のためには、微細配列されるプローブの均一度が前提されるべきである。

【0010】尚、異なるチップ上に存在する同一のプローブを用いてDNA変異やRNA発現の様相を繰り返して測定する場合は、その均一度に対する制御が非常に重要な意味をもつ。

【0011】従って、チップ制作段階でプローブの量及び均一度を制御する工程が必ず追加されるべきであり、微細配列されたスポット間の差を数値化して最終の使用者に供給され、その結果が補正できるようにするDNA

チップ品質検査方法が要求されている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は生化学物質を微細配列したチップの品質検査方法に関し、より詳しくは、DNA、RNA、タンパク質などのような生化学物質と反応せずに光または熱を発する化合物と、生化学的プローブとを混合して微細配列チップを制作し、該チップのスポットの発光度または発熱度及び配列様相を測定し、微細配列されたスポットの配列の均一性及び正確度を予め制御することにより、生化学物質微細配列チップを用いた各種検査の正確度を高めるための生化学物質微細配列チップの品質検査方法を提供することを目的とする。

【0013】本発明の更なる目的は、プローブと、前記プローブとは反応せずに光または熱を発する化合物との混合物が基板上に微細配列されている生化学物質微細配列チップを提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】前述した本発明の目的は、プローブと反応せずに光または熱を発する化合物とプローブとを混合する段階と、前記混合物を基板に微細配列させる段階と、前記微細配列された混合物のスポットをスキャンして発光度を測定する段階とを含む方法を提供することにより達成される。

【0015】また、選択的には、蛍光や熱の測定を通じて混成化後の蛍光や熱を算定する段階を更に包含しても良く、生化学物質微細配列チップの使用者は前記段階を通じて得られた数値を用い、プローブとターゲットとを混成化して蛍光や熱を測定する段階と、混成化後の蛍光や熱の測定値を用いて補正係数を求め、スポット間の誤差を標準化させる段階とを更にに行い、生化学物質微細配列チップを用いた検査においてより正確な結果が出せる方法を提供することにより、本発明の更なる目的を達成する。

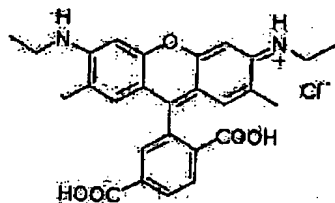
【0016】本発明の更なる目的は、プローブと、前記プローブと反応せずに光または熱を発する化合物との混合物が基板上に微細配列されている生化学物質微細配列チップを提供することである。

【0017】本発明に用いられるプローブは、核酸 (nucleic acid)、アミノ酸 (amino acid) を含むペプチド (peptide)、多糖類 (Polysaccharide)、リン脂質 (phospholipid) などの単量対が線形または円形に結合されている生体高分子から選択される。

【0018】また、本発明に用いられる前記プローブと反応せずに光または熱を発する化合物 (以下、標準標識物質と略記) としては、蛍光を発する物質 (fluorescent material)、化学的発光物質 (chemi-luminescent material)、生物学的発光物質 (bio-luminescent material) である。

ent material)、熱量測定可能物質 (calorimetric material)、または光散乱物質 (light-scattering material) から選択されるのが好ましく、特に前記重合体が核酸の連続的な序列である場合は、フルオレセイン (fluorescein)、クマリン (coumarin)、4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレセイン (JOE; 4', 5'-Dichloro-2', 7'-dimethoxy fluorescein)、テトラメチルローダミン (TAMRA; tetramethyl rhodamine)、X-ローダミン (ROX; X-rhodamine)、エオシン (Eosin)、オレゴングリーン (Oregon Green)、ローダミングリーン (Rhodamine Green)、ローダミンレッド (Rhodamine Red)、テキサスレッド (Texas Red)、ローダミンなどのローダミン系列やフルオレセイン

6-Carboxyrhodamine 6G, hydrochloride



【0021】ローダミン6Gを用いて生産されるチップの均一度を測定し、微細配列の品質を制御する過程に対するフローチャートは図1の通りである。より詳しくは、一定量のローダミンとプローブとを混合して微細配列し、チップスキャナーを用いてその均一度を検査し、蛍光度を測定し、数値化し、標準化した後、最終使用者にチップと共に供給することにより、DNAチップの研究により正確な結果解析を誘導する。

【0022】以下では、好ましい実施例を通じて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲が下記の実施例に限定されるものではない。

【0023】

【発明の実施の形態】

【0024】

【実施例】 【実施例1】 微細配列の均一度を測定するためのローダミン6Gの適正濃度決定
微細配列されたスポットの均一度及び標準化の資料作成のために用いられるローダミンは次のような条件を満たすべきである。第1の条件は、ローダミンの濃度は、蛍光度が弱すぎて探知されなかったり、強すぎて飽和 (saturation) しないように、スキャナーの探知可能な範囲内にあるべきである。第2の条件は、使用さ

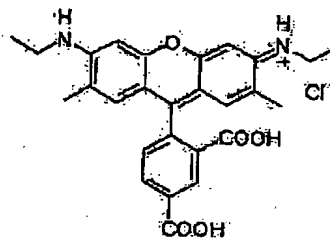
ン系列の誘導体から選択して使用するのが好ましい。

【0019】本発明に使用された下記の構造を有する二つの形態のローダミン (6-carboxyrhodamine 6G; 6-CR6G, 5-carboxyrhodamine 6G; 5-CR6G) は520nmで活性化され、波長545nmの蛍光を放出する。また、これらは、DNA、RNA、タンパク質などとは反応せず、微細配列の均一度を測定した後に、水または他の水溶液にて容易に水洗ができるため、微細配列の均一度を測定するために別途の追加装備を備えなくても良く、一般に用いられるチップスキャナーが使用できるという長所と、このような容易に水洗される性質と、DNAなどと反応しない性質とが追って行われる混成化などの過程に影響しないという長所とをもっている。

【0020】

【化1】

5-Carboxyrhodamine 6G, hydrochloride



れたローダミンが前記条件を満たすと共に容易に水洗され得る濃度のものであるべきである。第3の条件は、水洗後に次で行われる混成化などの過程に全然影響を及ぼさない濃度であるべきである。従って、下記の実施例は前記三つの条件を満たすローダミン6Gの最適濃度を決定するために実施された。

イ、ローダミン6Gの作製

10mMのローダミン6Gをメチルアルコールに溶かした後、その溶液10μLをとり、990μLのホウ酸ナトリウム緩衝溶液 (pH9.0; SB緩衝溶液) で希釈し、100pmol/μLの濃度にした。この100pmol/μLの溶液を前記のSB緩衝溶液で瞬時的に希釈して11種の濃度にした (図2参照)。

ロ、ローダミンとオリゴヌクレオチドとの混合液の微細配列

前記の各希釈液と同量の10pmol/μLのオリゴヌクレオチドとを混合した。この各混合液を、HT-Arrayer™ (株式会社バイオニア社製品、韓国) を用いて、14回ずつ繰り返してアクリルアミドゲルパッドに微細配列した。ゲルパッドは0.1%メタクリル酸グリシジル (glycidyl methacrylate) と、8%アクリルアミド (acrylamide)

と、1/20過硫酸塩アンモニウム (ammonium persulfate) と、1/100N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine; TEMED) とで構成された溶液30 μ Lを水洗されたスライドガラス上に塗抹し制作した。

ハ. スキャニングと水洗

微細配列されたスポットはチップスキャナー (Gene Pix 4000, Axon Instrument Inc, USA) を用いて532nmでローダミンを活性化させ、PMT 600 (photomultiplier 600) でスキャンしてその蛍光度に対する映像資料を得た後、常温で5分間水洗した。水洗されたチップは同一波長及びPMTで再びスキャンしてその結果を図2に示した。

【0025】図2は、10pmol/ μ Lのオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) と一定倍率で希釈されたローダミン6Gとを混合して微細配列したもので、30個の単量体で構成されたオリゴ (30mer oligo) と混合されるローダミンの量を増やしながら、aは532nmでローダミン6Gを活性化させ、bは微細配列を常温で5分間、水で水洗するなど相異なる条件でスキャンした結果である。Lane 1は1fmol/ μ L、Lane 2は5fmol/ μ L、Lane 3は10fmol/ μ L、Lane 4は50fmol/ μ L、Lane 5は100fmol/ μ L、Lane 6は500fmol/ μ L、Lane 7は1pmol/ μ L、Lane 8は5pmol/ μ L、Lane 9は10pmol/ μ L、Lane 10は50pmol/ μ L、そしてLane 11は100pmol/ μ Lのローダミンであり、これらと、同量の10pmol/ μ Lの30個の単量体にて構成されたオリゴ (30mer oligo) とを混合し、14回繰り返して微細配列した。スポットの平均直径は180 μ m、中心間の距離 (Center to center; CTC) は150 μ mであった。

【0026】図2に示したように、飽和した蛍光強度は500fmol/ μ L以上の濃度のときに現れた。また、1pmol/ μ Lの濃度からは、水洗した後に依然として蛍光強度が検出され、簡単な水洗では十分に除去されなかった。以上の結果に基づき、濃度が100fmol/ μ Lであるとき、飽和した蛍光強度を示さず、5分間の簡単な水洗によっても十分に除去されるため、該濃度を適正濃度として選択した。

二. 水洗条件の確定

前記で選択された100fmol/ μ Lのローダミンが、ゲルパッドチップに通常適用される遮断 (blocking) 溶液 (10%エタノールアミン) の処理によって容易に除去されるかどうかを調べた。

【0027】図3に示したように、100fmol/ μ

Lのローダミンと、10pmol/ μ Lの30個の単量体で構成されたオリゴとを同量混合してチップ上に微細配列した。aは配列の後に前記と同じく532nmで、bは配列の後に10%のエタノールアミンで常温で5分間水洗してPMT (photomultiplier tubes) 600で、cはPMT 900でスキャンしたものである。

【0028】即ち、図3に示したように、100fmol/ μ Lのローダミンは、10%のエタノールアミンで常温で5分間水洗したとき完全に除去された。一般に適用されるPMT 600とこれより高いPMT 900においても何の蛍光強度も感知されていなかった。このように、別的水洗過程を人為的に追加しなくても、ゲルパッドチップの使用過程において簡単に水洗でき、実験時間を短縮させるという長所がある。

【0029】以上の結果より、100fmol/ μ Lという最適濃度と、及び水または10%エタノールアミンを用いて常温で5分間という水洗条件とを確定した。

【0030】〔実施例2〕 混成化 (hybridization) 段階に及ぼすローダミン6Gの影響
実施例1によって確定された最適濃度及び水洗条件が適正に選ばれているかを確認するために下記の混成化実験を行った。

イ. ローダミンとオリゴヌクレオチドとの混合液の作製
2種類のオリゴ10pmol/ μ Lずつと100fmol/ μ Lのローダミンとを同量混合し、この2種の混合液を1:0~1.5:8.5の割合で順次的に混合した (図4参照)。

ロ. ローダミンオリゴヌクレオチド混合液の微細配列
各混合液を、19回繰り返してアクリルアミドゲルパッドにHT-ArrayerTMを用いて微細配列した。ゲルパッドは、0.1%メタクリル酸グリシジル (glycidyl methacrylate)、8%アクリルアミド (acrylamide)、1/20過硫酸塩アンモニウム (ammonium persulfate) 及び1/100N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine; TEMED) で構成された溶液30 μ Lを、水洗されたスライドガラス上に塗抹し制作した。

ハ. スキャニングと水洗

微細配列されたスポットはチップスキャナー (Gene Pix 4000, Axon Instrument Inc, USA) を用いて532nmでローダミンを活性化させ、PMT 600 (photomultiplier 600) でスキャンしてその蛍光度に関する映像資料を得た後、10%エタノールアミンで常温で、5分間水洗した。

二. 混成化

微細配列された2種類のオリゴと100%相補的な塩基

序列をもつ5'末端がcy3またはcy5で標識されたターゲットとを用いて混成化した。1 pmolの蛍光で標識されたターゲットと、20 μ Lの混成化緩衝溶液(1M NaCl, 1mM EDTA, 1% Tween 20及び5mM sodium phosphate)とを混合し、40℃で1時間反応させた後、0.1倍の混成化溶液を用いて65℃で15分間水洗し、反応しないターゲット及び非特異的混成化物を除去した。

ニ. スキャンニング

混成化物の蛍光度は、チップスキャナー (GenePix 4000, Axon Instrument Inc, USA) を用いて532nmでcy3を、650nmでcy5を同時に活性化させた後、蛍光度に対する映像資料を得た。

【0031】図4に示したように、aは、2種のオリゴ (comp-cy3及びcomp-cy5) 10 pmol/ μ Lを混合した混合物と、100 pmol/ μ Lのローダミンとを混合して微細配列した結果を示す図である。bは、該微細配列が532nmで活性化制御過程を経た後、エタノールアミンにより常温で5分間水洗され、前記2種のオリゴと100%相補的に結合できるcy3とcy5が標識されたターゲットオリゴ (target oligo) で混成化され、cy3は532nmで、cy5は635nmで活性化された後の蛍光度を測定した結果である。ここで、緑色はcy3から、赤色はcy5から由来した蛍光であり、黄色の場合は二つの蛍光が混合されたことを表わす。図において、Lane 1~Lane 18は、10 pmol/ μ Lの濃度を有するcomp-cy3とcomp-cy5とを1:0~1:5:8.5の割合で順次的に混合し、10 pmol/ μ Lのローダミンと混合してから微細配列したものである。

【0032】即ち、緑色はcy3から、赤色はcy5から由来したもので、黄色はこの二つの蛍光強度の混合であり、その様相において、混合された2種類のプローブオリゴの混合割合と一致していると判定された。これは、微細配列の均一度を把握するために使用したローダミンは、混成化段階において何の影響も及ぼしていないことを示し、特に2種の蛍光物質が別々に標識されたターゲットが、一つのスポットに混成化物を作る競争的混成化にも何の影響も及ぼしていないことを示す。

【0033】これで、ローダミン6Gは、遺伝子分析を目的とした測定過程において、実験の誤差をもたらす何の影響も及ぼしていないため、チップスキャナー微細配列の均一度を測定するための材料にて十分に活用され得ることを証明した。

【0034】【実施例3】 微細配列されたスポット間の変異標準化
本実施例は、微細配列されたスポットの変異を補正することができる補正係数の簡単な算出例を示すために実施

された。しかし、補正係数の算出方法は本実施例に限定されるものではない。

イ. ローダミンとオリゴヌクレオチドとの混合液の作製
一種類のオリゴヌクレオチド100 pmol/ μ Lとローダミン6G100 fmol/ μ Lとを同量混合した後、この混合液を緩衝溶液で再び2倍及び4倍に希釈し、各濃度を3個ずつ微細配列した(図5a)。

【0035】図5において、Lane 1~Lane 3は希釈していないもので、Lane 4~Lane 6は2倍に、Lane 7~Lane 9は4倍に希釈してから微細配列したものである。

ロ. スキャンニングと水洗

微細配列されたスポットは、チップスキャナー (GenePix 4000, Axon Instrument Inc, USA) を用い、532nmでローダミンを活性化させ、PMT600でスキャンしてその蛍光度に対する映像資料を得た後、10%エタノールアミンで常温で5分間水洗した。

ハ. 混成化

微細配列されたオリゴヌクレオチドと100%相補的な塩基序列をもつ5'末端がcy3で標識されたターゲットを用いて混成化した。1 pmolの蛍光で標識されたターゲットと20 μ Lの混成化緩衝溶液(1M NaCl, 1mM EDTA, 1% Tween 20及び5mM sodium phosphate)とを混合し、40℃で1時間反応させた後、0.1倍の混成化溶液を用いて65℃で15分間水洗し、反応しないターゲット及び非特異的混成化物を除去した。

ニ. スキャンニング

混成化物の蛍光度は、チップスキャナー (GenePix 4000, Axon Instrument Inc, USA) を用いて、532nmでcy3を同時に活性化させてから映像資料を得た(図5b)。

【0036】表1は、図1に示された各スポットに対して微細配列させた後、そして混成化させた後に得られた平均蛍光強度であり、使用された面積は50 μ mの半径を有する円の面積(7850 μ m²)から得られたものである。微細配列の後、ローダミンの蛍光強度は、微細配列されたオリゴの濃度によって直線的に比例しており($y=541, 63x-12861$)、信頼度R²は0.9453であった。また、微細配列の後、ローダミン6Gより得られた蛍光強度は混成化後に得られたcy3からの蛍光と高い相関度(相関係数0.9096)を示していた。即ち、これは微細配列された量的変異が最終的には混成化の結果に直接的に影響を及ぼしていることを示し、実際チップ制作のとき、このような変異があれば、必ず数値化して補正できるように提供されるべきである。表1は図5に示された各スポットに対する微細配列後と混成化後に得られた平均蛍光強度値である。

【0037】図6は、各スポットに対する蛍光強度を5

32 nmで活性化させて得た後、7850 μm^2 の面積に存在の蛍光強度の平均値を用い、微細配列後と混成化後の蛍光値に対する回帰式を推定した結果である。推定された回帰式は、 Y (混成化後の強度) = 2836.6 Ln (X ; 微細配列後の強度) - 18970であり、信頼度は0.9646である対数関数であった。

【0038】これを用いてローダミン6Gの蛍光度 (1000~100000) に対応するcy3の蛍光度を類推した結果である。ここで、ローダミン6Gの蛍光度は微細配列されるプローブ例えばオリゴの量的な差を表わし、1000~100000の蛍光度は100 fmol/ μL の濃度を用いた場合、可能変異範疇の殆どを含む。補正係数は、微細配列後の蛍光強度の算術平均を求め、これを混成化後の蛍光強度 (11749.61) に転換した後、この値 (11749.61) から混成化後の蛍光強度値を引くとき得られる。また、該補正係数と実際の蛍光強度値を合計すると、その値は常に11749.61に標準化された。

【0039】これをより詳しく説明すると、一定濃度のプローブを100 fmol/ μL のローダミンで希釈して微細配列した場合、スポット間の量的変異はローダミンの蛍光強度の変異として現われ、結局には混成化後の

蛍光強度に影響を及ぼすことになる。例えば、スポットAは、微細配列後は1000の蛍光度を、混成化後は1000の蛍光度を示し、別のスポットBは、微細配列後は2000の蛍光度を、混成化後は1500の蛍光度を示したと仮定すれば、実際、混成化後の絶対蛍光強度としてみたとき、スポットBにより多くのターゲットが混成化されたと言える。

【0040】しかし、このような蛍光強度の差においては、微細配列されたプローブの量に基づく部分を補正しなければ正確な比較ができない。該当の補正係数1125.07と9158.89をそれぞれスポットAとBの蛍光度に足すと、Aは1225.07に、Bは11158.89に標準化され、実際、同一量のプローブがスポット内に存在していれば、Aスポットにより多くのターゲットが混成化されたとの結論を下すことができる。

【0041】このように、補正係数は最終段階において、結果解析により正確度を高めるのに緊要に使われる。表2は回帰式 (Y (混成化後の強度) = 2836.6 Ln (X ; 微細配列後の強度) - 18970) から推定された補正係数を示す。

【0042】

【表1】

スポットが形成し混成化した後のオリゴマーの夫々の濃度に応じた平均蛍光強度値

スポット 番号	スポットになった オリゴマーの濃度 (pmol/ μL)	スポット形成 後の532 nmにおける平均 蛍光強度値	混成化後の5 32 nmにおける平均蛍光 強度値
1	100	50308	11889
2	100	38592	10630
3	100	38254	10848
4	50	12190	8069
5	50	9338	6822
6	50	11395	7952
7	25	3676	5497
8	25	2534	3090
9	25	2428	2282

【0043】

【表2】

回帰式 ($Y = 2836.6 \text{Ln}(X) - 18970$) から推定された補正係数

スポット形成後の532nmにおける蛍光強度値	混成化後の532nmにおける平均蛍光強度値	補正係数	混成化後の532nmにおける標準化された平均蛍光強度値
1000□	624.5386244□	11125.07138□	11749.61□
2000□	2590.719917□	9158.890083□	11749.61□
3000□	3740.862242□	8008.747758□	11749.61□
4000□	4556.901209□	7192.708791□	11749.61□
5000□	5189.870207□	6559.739793□	11749.61□
6000□	5707.043535□	6042.566465□	11749.61□
7000□	6144.307353□	5606.302647□	11749.61□
8000□	6523.082501□	5226.527499□	11749.61□
9000□	6857.18586□	4892.42414□	11749.61□
10000□	7156.051499□	4593.558501□	11749.61□
11000□	7426.408355□	4323.201645□	11749.61□
12000□	7673.224827□	4076.385173□	11749.61□
13000□	7900.378972□	3849.336028□	11749.61□
14000□	8110.488648□	3639.121854□	11749.61□
15000□	8306.193825□	3443.416175□	11749.61□
16000□	8489.263794□	3260.346206□	11749.61□
17000□	8661.231596□	3088.378404□	11749.61□
18000□	8823.367153□	2926.242847□	11749.61□
19000□	8976.734238□	2772.375767□	11749.61□

【0044】

(表2の続き)

20000□	9122.232792□	2627.877208□	11749.61□
21000□	9260.630971□	2488.979029□	11749.61□
22000□	9392.589648□	2357.020352□	11749.61□
23000□	9518.681617□	2230.928483□	11749.61□
24000□	9639.40812□	2110.20388□	11749.61□
25000□	9755.201789□	1994.408211□	11749.61□
26000□	9866.455264□	1883.154736□	11749.61□
27000□	9973.509478□	1776.100522□	11749.61□
28000□	10076.66994□	1672.940062□	11749.61□
29000□	10176.20998□	1573.400024□	11749.61□
30000□	10272.87512□	1477.284883□	11749.61□
31000□	10366.38673□	1384.223271□	11749.61□
32000□	10455.44509□	1294.164914□	11749.61□
33000□	10542.73197□	1206.878027□	11749.61□
34000□	10627.41289□	1122.197112□	11749.61□
35000□	10709.63894□	1039.971064□	11749.61□
36000□	10789.54846□	960.0615548□	11749.61□
37000□	10867.26838□	882.3416246□	11749.61□
38000□	10942.91553□	806.694475□	11749.61□
39000□	11018.59759□	733.0124102□	11749.61□
40000□	11088.41408□	661.1959161□	11749.61□
41000□	11158.45715□	591.1528512□	11749.61□
42000□	11226.81226□	522.7977364□	11749.61□
43000□	11293.65887□	456.0511275□	11749.61□
44000□	11358.77094□	390.8390601□	11749.61□
45000□	11422.51744□	327.0925572□	11749.61□
46000□	11484.86281□	264.7471904□	11749.61□
47000□	11545.86731□	203.7426886□	11749.61□

(表2の続き)

48000□	11605.58741□	144.0225881□	11749.61□
49000□	11664.07608□	85.53391802□	11749.61□
50000□	11721.38308□	28.22691844□	11749.61□
51000□	11777.85521□	-27.94521415□	11749.61□
52000□	11832.63656□	-83.02655649□	11749.61□
53000□	11888.66867□	-137.0586663□	11749.61□
54000□	11939.69077□	-190.0807708□	11749.61□
55000□	11991.73994□	-242.1299376□	11749.61□
56000□	12042.86123□	-293.2412303□	11749.61□
57000□	12093.05785□	-343.4478507□	11749.61□
58000□	12142.39127□	-392.7812681□	11749.61□
59000□	12190.88184□	-441.2713377□	11749.61□
60000□	12238.55641□	-488.9464096□	11749.61□
61000□	12285.44343□	-535.8334275□	11749.61□
62000□	12331.56802□	-581.958021□	11749.61□
63000□	12376.95459□	-627.3445892□	11749.61□
64000□	12421.62838□	-672.0163786□	11749.61□
65000□	12465.60555□	-715.9955541□	11749.61□
66000□	12508.91827□	-759.3032656□	11749.61□
67000□	12551.56971□	-801.9597085□	11749.61□
68000□	12593.59418□	-843.9841809□	11749.61□
69000□	12635.00514□	-885.3951353□	11749.61□
70000□	12675.82023□	-926.210228□	11749.61□
71000□	12716.05636□	-966.4463636□	11749.61□
72000□	12755.72974□	-1006.119738□	11749.61□
73000□	12794.85588□	-1045.245875□	11749.61□
74000□	12833.44967□	-1083.839668□	11749.61□
75000□	12871.62541□	-1121.915407□	11749.61□

(表29続)

76000□	12909.09882□	-1159.486817□	11749.61□
77000□	12946.17708□	-1196.567084□	11749.61□
78000□	12982.77888□	-1233.168882□	11749.61□
79000□	13018.9144□	-1269.304403□	11749.61□
80000□	13054.59538□	-1304.985376□	11749.61□
81000□	13089.8381□	-1340.223097□	11749.61□
82000□	13124.63844□	-1375.028441□	11749.61□
83000□	13159.02189□	-1409.411892□	11749.61□
84000□	13192.99356□	-1443.383556□	11749.61□
85000□	13226.56318□	-1476.958179□	11749.61□
86000□	13259.74016□	-1510.130165□	11749.61□
87000□	13292.53359□	-1542.923594□	11749.61□
88000□	13324.95223□	-1575.342222□	11749.61□
89000□	13357.00455□	-1607.394551□	11749.61□
90000□	13388.69874□	-1639.088735□	11749.61□
91000□	13420.0427□	-1670.482701□	11749.61□
92000□	13451.0441□	-1701.434102□	11749.61□
93000□	13481.71035□	-1732.100347□	11749.61□
94000□	13512.0486□	-1762.438604□	11749.61□
95000□	13542.06582□	-1792.455815□	11749.61□
96000□	13571.7687□	-1822.158704□	11749.61□
97000□	13601.16379□	-1851.553786□	11749.61□
98000□	13630.25737□	-1880.647374□	11749.61□
99000□	13659.05559□	-1909.445591□	11749.61□
100000□	13687.56437□	-1937.954374□	11749.61□

【0047】

【発明の効果】 前述したように、本発明における品質検査制御過程を、チップ (chip) の大量生産工程に導入することにより、消費者に均一度の高い高品質のチップを供給することができる。尚、本発明において、品質制御段階で得られたスポットの量的な差に関する資料と、前記生産されたチップとを共に使用者に供給することにより、是を利用した研究が、最終段階で微細配列させたプローブの量による変異を補正することができる機会を与えることにより、使用者が結果に対してより正確な解析ができるようにする効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は微細配列の品質を制御して最終段階で結果を標準化させる過程に関するフローチャートである。

【図2】 図2はオリゴヌクレオチドと一定の倍率で希釈されたローダミンとを混合して微細配列したものである。

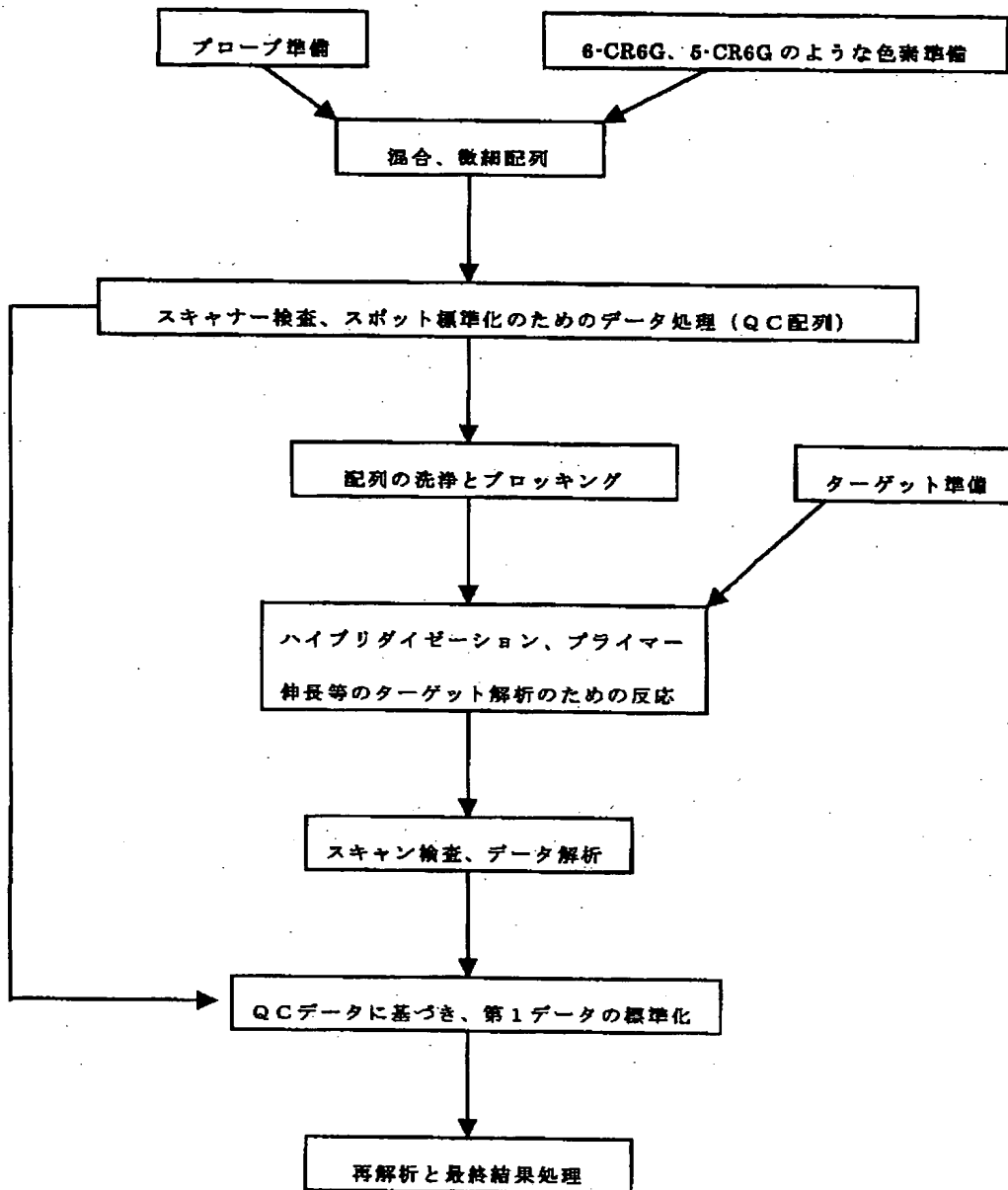
【図3】 図3はローダミンと30個のオリゴヌクレオチド (30mer) とを同量混合してチップ上に微細配列したものである。

【図4】 図4はローダミンを用いたチップの制御過程が混成化実験に及ぼす影響を表わす実施例である。

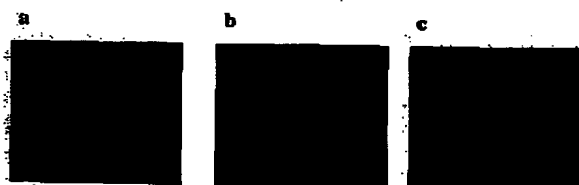
【図5】 図5はオリゴヌクレオチドとローダミンとを混合して2倍々希釈を2回行った後に微細配列したものである。

【図6】 図6は微細配列後及び混成化後の蛍光値に対する回帰式を推定した結果である。

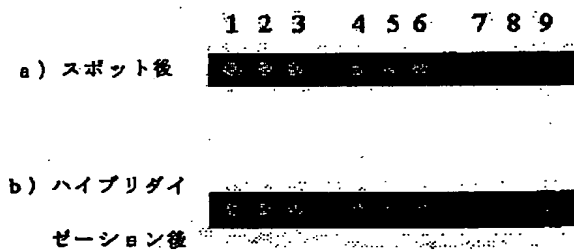
【図1】



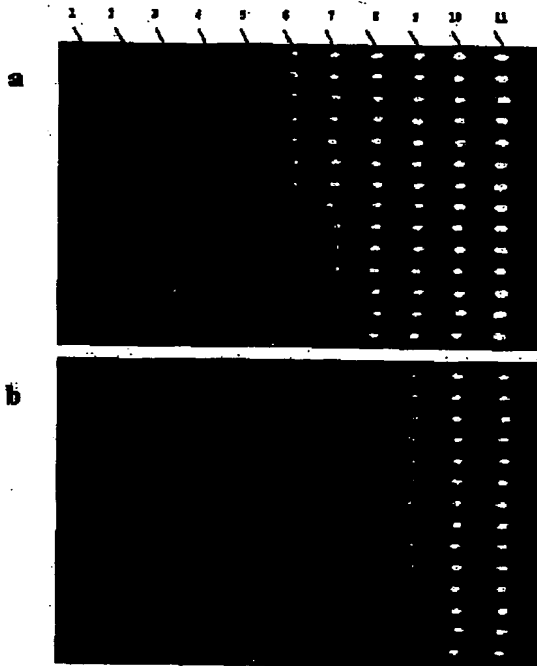
【図3】



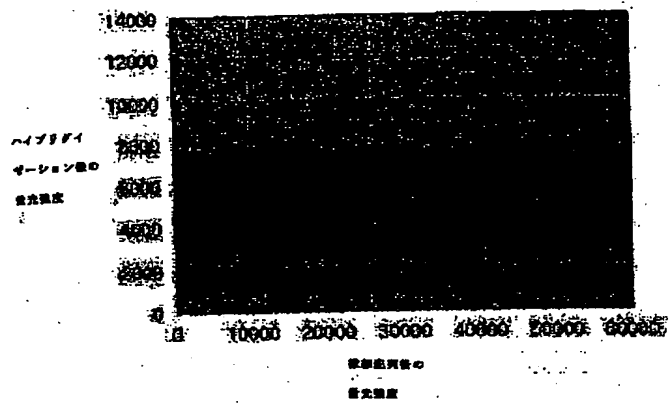
【図5】



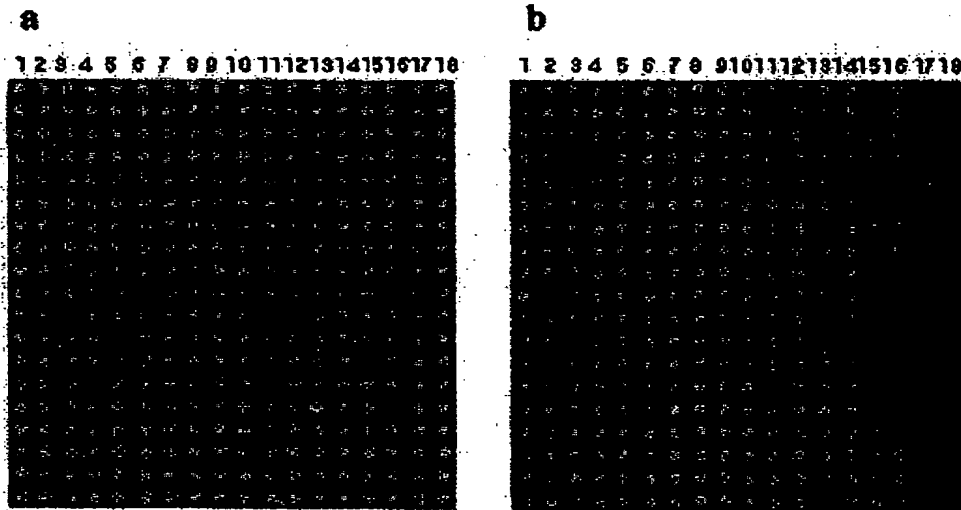
【図2】



【図6】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 37/00

識別記号

1 0 2

F I

C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

F

BEST AVAILABLE COPY

(72)発明者 グイ ファン, オ
大韓民国, 306-220 テジョン, テドク
グ, ムンピョンドン, 49-3
(72)発明者 ジェ ドン, リ
大韓民国, 306-220 テジョン, テドク
グ, ムンピョンドン, 49-3

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 GA18
GA19 HA14
4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB20
CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ42 QQ61
QR32 QR38 QR41 QR55 QR66
QR82 QS12 QS34 QS39 QX02
QX10